

**GABRIELA DUARTE FREITAS**

**DIVERSIDADE MICROBIANA, PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE  
AERÓBIA DE SILAGEM DE MILHO INOCULADA COM CEPAS DE  
*Lentilactobacillus buchneri* EM DIFERENTES PERÍODOS DE  
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Odilon Gomes Pereira

Coorientadora: Karina Guimarães Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F866d  
2024  
Freitas, Gabriela Duarte, 1997-  
Diversidade microbiana, perfil fermentativo e estabilidade  
aeróbia de silagem de milho inoculada com cepas de  
*Lentilactobacillus buchneri* em diferentes períodos de  
armazenamento / Gabriela Duarte Freitas. – Viçosa, MG, 2024.  
1 dissertação eletrônica (47 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Odilon Gomes Pereira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Zootenia, 2024.  
Referências bibliográficas: f. 41-47.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.420>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Milho - Silagem - Composição. 2. Metagenômica.  
3. Fermentação. I. Pereira, Odilon Gomes, 1960-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootenia.  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.0862

**GABRIELA DUARTE FREITAS**

**DIVERSIDADE MICROBIANA, PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE  
AERÓBIA DE SILAGEM DE MILHO INOCULADA COM CEPAS DE  
*Lentilactobacillus buchneri* EM DIFERENTES PERÍODOS DE  
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 22 de fevereiro de 2024

Assentimento:



Documento assinado digitalmente  
**GABRIELA DUARTE FREITAS**  
Data: 05/07/2024 15:34:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Gabriela Duarte Freitas  
Autora



Documento assinado digitalmente  
**ODILON GOMES PEREIRA**  
Data: 24/07/2024 10:35:07-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Odilon Gomes Pereira  
Orientador

*A DEUS,  
Aos meus pais pelo amor e incentivo, às  
minhas irmãs pelo carinho e amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus pais, Silvério e Marcela e minhas irmãs Isabela, Júlia e Mariah, que me incentivaram nos momentos difíceis, sempre me apoiaram, compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho e me serviram de inspiração. A minha família, pelo apoio, em especial a minha Vó Sãozinha que me acolheu em sua casa e meus avós Silvério e Inês pelo apoio emocional.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período em que me dediquei a este trabalho, em especial a Aline, Paulo, Cidinha, Alice, Alex e Eduarda que vivenciaram comigo os desafios e me ajudaram a vencê-los, agradeço o carinho, o apoio, o acolhimento, a paciência, os conselhos, os ensinamentos e as palavras motivadoras.

A todos os professores, que muito contribuíram com minha formação acadêmica, agradeço os ensinamentos, as orientações, as lições de vida. Vocês são verdadeiros mestres.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e ao Laboratório de Forragicultura pela oportunidade.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao professor Odilon Gomes Pereira pela orientação, oportunidade e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores João Paulo Riqueira e a professora Karina Ribeiro por terem aceitado o convite de participar da banca.

Aos colegas do Laboratório de Forragicultura: Gabriela Bedeschi, Gabriela Leite, Alberto Macêdo, Thiago Fernandes, Thiago Neves, Felipe Almeida e Hosnerson Renan pela ajuda e condução desse trabalho, e principalmente pelo companheirismo e risadas.

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo  
menos outros dez”.*  
(George Bernard Shaw)

## RESUMO

FREITAS, Gabriela Duarte, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Diversidade microbiana, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia de silagem de milho inoculada com cepas de *Lentilactobacillus buchneri* em diferentes períodos de armazenamentos.** Orientador: Odilon Gomes Pereira. Coorientadora: Karina Guimarães Ribeiro.

Objetivou-se investigar os efeitos da inoculação com a cepa de *L. buchneri* 90.14, obtida em condições tropicais, e cepa de *L. buchneri* comercial, sobre a diversidade microbiana fúngica, características fermentativas, perdas, estabilidade aeróbia e composição química de silagens de milho planta-inteira, com diferentes tempos de abertura dos silos após a ensilagem. Foi utilizado um esquema fatorial 3×3 [dois inoculantes (INOC) mais o controle e três tempos de abertura (TA)], no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os inoculantes avaliados foram: controle (CON; sem inoculante), Lalsil As, (Lallemand, Brasil), e, cepa de *L. buchneri*, isolado 90.14 (LB 90.14). Os tempos de abertura foram: 20 (D20), 40 (D40) e 60 (D60) dias. Houve efeito de TA para nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e ácido propiônico, com maiores teores em D60. Houve efeito de TA e INOC para o teor de MS das silagens; as silagens do D20 e D40 apresentaram maior teor de MS em relação a D60, com mais altos teores nas silagens inoculadas. Houve efeito do inoculante para ácido lático (AL), ácido propiônico (AP) e carboidratos solúveis em água (CHOS). Concentrações de AL foram menores para silagens inoculadas com cepa selvagem. Houve efeito de interação TA×I sobre as variáveis FDA, NIDA, amido, pH, bactérias do ácido lático, leveduras e ácido acético. Após sete dias de exposição aeróbia, houve efeito de interação TA×I para todas as variáveis avaliadas, exceto para recuperação de matéria seca (RMS), que foi afetada por local e por inoculante. O teor de matéria seca (MS) não foi afetado por nenhum dos fatores avaliados. As silagens inoculadas com o LB 90.14 apresentaram menor população de leveduras e de mofos e maior estabilidade aeróbia. Houve maior diversidade e abundância do grupo *Candida ethanolica* nas silagens inoculadas. Conclui-se que a cepa LB 90.14 melhora a estabilidade aeróbia de silagens de milho, portanto, apresenta potencial para a produção de silagens de boa qualidade e possibilita a abertura do silo após 20 dias de armazenamento.

Palavras-chave: Composição química; Metagenômica; Heterofermentativo.

## ABSTRACT

FREITAS, Gabriela Duarte, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Microbial diversity, fermentative profile and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lentilactobacillus buchneri* Strains in different storage periods.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-advisers: Karina Guimarães Ribeiro.

The objective of this study was to investigate the effects of inoculation with the *L. buchneri* 90.14 strain, obtained in tropical conditions, and the commercial *L. buchneri* strain, on fungal microbial diversity, fermentative characteristics, losses, aerobic stability and chemical composition of corn silages. whole plant, with different silo opening times after ensiling. A 3×3 factorial scheme was used [three inoculants (INOC) and three opening times (TA)], in a completely randomized design, with four replications. The inoculants evaluated were control (CON; without inoculant), Lalsil As, (Lallemand, Brazil), and *L. buchneri* strain, isolate 90.14 (LB 90.14). The opening times were: 20 (D20), 40 (D40) and 60 (D60) days. There was an effect of TA for ammonia nitrogen (N-NH<sub>3</sub>) and propionic acid, with higher levels in D60. There was an effect of TEMP and INOC on the DM content of the silages; D20 and D40 silages had higher DM content compared to D60, with higher levels in inoculated silages. There was an effect of the inoculant for lactic acid (LA), propionic acid (PA) and water-soluble carbohydrates (CHOS). LA concentrations were lower for silages inoculated with the wild strain. There was a TA×I interaction effect on the variables FDA, NIDA, starch, pH, lactic acid bacteria, yeast, and acetic acid. After seven days of aerobic exposure, there was a TA×I interaction effect for all variables evaluated, except for dry matter recovery (RMS), which was affected by location and inoculant. The Dry Matter (DM) content was not affected by any of the factors evaluated. Aerobic stability was greater for silages inoculated with LB 90.14. Silages inoculated with isolate 90.14 showed a lower population of yeast and mold. There was greater diversity and abundance of the *Candida ethanolica* groups in the silage. It is concluded that the LB 90.14 strain improves the aerobic stability of corn silages, therefore, it has potential to produce good quality silages.

Keywords: Chemical composition; Metagenomics; Heterofermentative.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3. MATERIAI E MÉTODOS .....	17
3.1 Local do experimento .....	17
3.2 Delineamento experimental.....	17
3.3 Preparo dos inoculantes microbianos.....	18
3.3.1 Cepa selvagem .....	18
3.3.2 Inoculante comercial.....	18
3.4 Cultivo, ensilagem do milho e abertura dos silos.....	18
3.5 Perfil fermentativo e populações microbiana.....	20
3.6 Análises químicas.....	21
3.7 Estabilidade aeróbia.....	21
3.8. Recuperação de matéria seca.....	21
3.9 Extração, purificação e sequenciamento de DNA .....	22
3.10. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS .....	24
4.1. Forragem antes da ensilagem.....	24
4.2. Composição química, perfil fermentativo e população microbiana das silagens	24
4.3. Estabilidade aeróbia .....	28
4.4 Diversidade microbiana .....	31
5. Discussão.....	36
5.1. Composição química, perfil fermentativo e população microbiana das silagens	36
5.2. Estabilidade aeróbia .....	37
5.3 Diversidade microbiana .....	38
5. CONCLUSÕES .....	40
REFERÊNCIAS.....	41

## 1. INTRODUÇÃO

A ensilagem de culturas forrageiras consiste em um processo de conservação de alimentos em meio ácido, devido a conversão de carboidratos solúveis em água (CHOs) em ácidos orgânicos, os quais promovem a redução do pH e conservação do material. De acordo com Kung Junior et al. (2018), o principal objetivo no processo de ensilagem é conservar a forragem, com menores perdas possíveis, e que o produto final se assemelhe ao material de origem.

A planta de milho (*Zea mays* L.) é a forrageira mais utilizada para ensilagem, pois apresenta facilidade de plantio e manejo, alta produção de matéria seca (MS) por unidade de área, satisfatório valor nutritivo, adaptabilidade ao clima tropical, adequados teores de MS e de CHOs ao atingir o ponto maturidade, além de possuir baixa capacidade tampão, o que favorece o padrão de fermentação adequado no silo (Filya & Sucu, 2010; Ferraretto & Shaver, 2015).

As perdas no processo de ensilagem podem acontecer durante o processo fermentativo e após a abertura devido à condição aeróbica. No milho as perdas pós aberturas se destacam devido ao elevado valor nutricional destas. As leveduras são responsáveis por iniciar a deterioração da silagem, como descrito por Wilkinson e Muck (2019), já que utilizam carboidratos residuais e ácido lático como substratos para seu crescimento. Assim, essas causam aumento de pH, temperatura e perdas de MS na forma de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, além de permitir que outros microrganismos se desenvolvam, como mofo, bacilos, bactérias do ácido acético, entre outros (Kung et al., 2018). Silagens deterioradas apresentam redução no valor nutritivo, diminuição da aceitabilidade e conseqüente menor desempenho animal (Borreani et al., 2018; Auerbach e Nadeau, 2020). Sendo assim tecnologias que permitam a diminuição destas perdas são de suma importância.

Em estudos realizados por Kung et al. (2021) e Muck et al. (2018), constataram que o uso de inoculantes microbianos contendo *Lactobacillus buchneri* têm reduzido as perdas decorrentes da deterioração aeróbia. Segundo de Heintz et al. (2012), as bactérias do ácido lático (BAL) são classificadas como heterofermentativas obrigatórias, sendo capazes de converter os carboidratos solúveis em água (CHOs), pela via da fosfoctolase, a ácido lático, acético e etanol. Além disso, são capazes de degradar o ácido lático a ácido acético e 1,2-propanodiol, em condições anaeróbicas,

os quais, segundo Silva et al. (2018), podem inibir o crescimento de leveduras e assim, preservar a qualidade nutricional da silagem quando exposta ao ar.

O uso de Inoculantes reduzir as perdas de nutrientes da forragem, reduz os custos do produtor rural, aumentando taxa de recuperação da silagem, diminui as perdas de proteínas e energia das forragens, além de melhorar a digestibilidade das fibras e a conversão alimentar. Sem falar que o inoculante uso do reduz a formação de ácidos e gases nocivos no organismo dos animais. Em um estudo realizado em Rabelo com silagens de milho inoculadas com bactérias ácido-láticas, a aplicação de BAL melhorou a composição bromatológica e digestibilidade in vitro.

A identificação de microrganismos através do seu DNA permite mais precisão na classificação de comunidades microbianas, conhecer os microrganismos presentes naquela silagem e assim conseguir ter mais precisão no controle de qualidade do alimento que será fornecido para os animais, além de que por meio desses microrganismos podemos selecionar cepas que serão capazes de trazer benefícios a silagem e assim podendo lançar novos inoculantes comerciais. A seleção de novas cepas e o conhecimento de seus metabolismos, melhoram o entendimento sobre as interações que ocorrem durante a fermentação. Conforme relatado Costa et al. (2021), Guan et al. (2020), Silva et al. (2018), e Wang et al. (2018) há crescente número de estudos sobre a triagem e os efeitos da utilização de novas cepas bacterianas como inoculantes de silagens.

Para Gallagher et al. (2018) e McAllister et al. (2018), o avanço das tecnologias de biologia molecular possibilitou o uso de técnicas para o estudo de microrganismos não cultiváveis que estão presentes em um dado ecossistema. Através da identificação genômica (material genético), utilizando-se o DNA (ácido desoxirribonucleico), é possível obter com maior acurácia os microrganismos presentes em um determinado ambiente.

Portanto, conhecer o microbioma de silagens pode contribuir para um melhor entendimento de como as comunidades microbianas se desenvolvem e seus efeitos na fermentação da silagem. Segundo Tennant et al. (2017), uma melhor compreensão destes processos, pode-se melhorar a qualidade e a estabilidade das silagens.

Outro ponto a ser analisado são os períodos de abertura de um silo. O tempo de permanência da vedação do silo tem que ser suficiente para que ocorra o processo

de fermentação, com abaixamento do pH a níveis que impeçam o crescimento de microrganismos indesejáveis (Pinto et al., 2007).

Dessa forma, a hipótese para o presente estudo é que a inoculação com a cepa 90.14 de *L. buchneri* pode melhorar o perfil fermentativo e aumentar a estabilidade aeróbia da silagem de milho. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação com a cepa 90.14 de *L. buchneri*, comparativamente a uma cepa de *L. buchneri* comercial e a silagem controle, sobre a diversidade microbiana fúngica, as características fermentativas, perdas, a estabilidade aeróbia e composição química de silagens de milho planta-inteira, com tempo de abertura dos silos com 20, 40 e 60 dias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A pecuária moderna tem como objetivo atender à crescente demanda por alimentos da população mundial, que poderá ser de nove bilhões de pessoas, em 2050 (OECD/FAO, 2021). Nesse contexto, a criação de ruminantes em ambiente pastoril é o sistema mais comum realizado em regiões tropicais. No entanto, devido a sazonalidade climática, ocorre limitação no crescimento do pasto, principalmente das gramíneas durante a estação de inverno, caracterizado como o período seco do ano na região centro-sul do Brasil. Dessa forma, a conservação de forragem por meio de práticas, como fenação e ensilagem, são estratégias importantes na preservação de alimentos para serem ofertados aos animais, durante o período de estiagem (Pahlow et al., 2003; Daniel et al., 2019; Muck et al., 2020).

O clima tropical é caracterizado por altas temperaturas e elevado teor de umidade, o que desfavorece a produção de feno de qualidade. Assim, o armazenamento da forragem como silagem prevalece nessa região (Silva et al., 2019; Daniel et al., 2019). Essa técnica consiste na conservação da forragem pela fermentação láctica espontânea, que ocorre em ambiente anaeróbio. As bactérias ácido lácticas, principais microrganismos fermentadores, metabolizam os carboidratos solúveis em água (CHOs) presentes na planta, produzindo ácidos orgânicos, com destaque para o ácido láctico. Como resultado, o pH da massa ensilada é reduzido e a forragem armazenada é preservada em meio ácido (Weinberg & Muck, 1996; Pahlow Et Al., 2003). Essa fermentação também decorre de uma variedade de outros microrganismos epifíticos, muitos dos quais são indesejáveis (McDonald et al., 1991; Schmidt & Kung Jr., 2010).

O milho, é fonte de energia, em consequência do amido presente nos grãos, e de fibra fisicamente efetiva, proveniente da fração vegetativa (Ferraretto et al., 2018). Porém a silagem de milho apresenta tipicamente uma fermentação homoláctica, com baixa formação de ácido acético ou propiônico, os quais apresentam ação antifúngica. Por esse motivo e por apresentar grande disponibilidade de substratos, a silagem de milho é propensa a deterioração aeróbia, quando o silo é aberto, sendo este processo iniciado principalmente por leveduras (Muck et al., 2018; O'Kiely e Muck, 1992). Por esses motivos, existem alguns desafios no processo de produção de silagem de milho, com destaque para a deterioração aeróbia.

De acordo com Kung Jr. et al. (2003), define-se estabilidade aeróbia como o tempo observado em que a massa ensilada, após a abertura do silo e de exposição aeróbia, apresente aumento de 2°C acima da temperatura ambiente. A perda das condições de anaerobiose gera alterações na população microbiana, levando a deterioração da silagem. O uso de CHOs e produtos da fermentação, por microrganismos indesejáveis, podem causar aumento do pH e das perdas de MS na forma de CO<sub>2</sub>, ocorrendo aumento da temperatura da silagem, iniciando-se assim a deterioração e redução do seu valor nutritivo.

A taxa de deterioração varia entre os tipos de forragens ensiladas, pois provém dos microrganismos presentes no material a ser ensilado e das circunstâncias que esses encontram para se desenvolverem ou serem inibidos (McDONALD et al., 1991; Ávila & Carvalho, 2020). Entre as silagens, a de milho, quando fermentada em condição espontânea, é particularmente mais susceptível a deterioração aeróbia (Ashbell & Weinberg, 1992; Kung Jr. et al., 1998), pois contém maior disponibilidade de substratos (CHOs residuais e ácido lático) para os microrganismos deteriorantes, e menor quantidade de substâncias inibidoras destes microrganismos (CAI et al., 1999). Assim, o aumento de ácidos orgânicos, como o acético e propiônico, poderia prolongar a estabilidade aeróbia, pois estes são inibidores de microrganismos deteriorantes (Moon, 1983).

As leveduras assimiladoras de ácido lático e de CHOs são responsáveis por iniciar a deterioração aeróbia nas silagens (Pahlow et al., 2003). Assim que a massa ensilada é exposta ao ar, esses microrganismos crescem, e, concomitantemente, a temperatura e o pH da silagem aumentam, proporcionando ambiente favorável ao desenvolvimento de outras bactérias e de fungos filamentosos, conseqüentemente, promovendo aquecimento e deterioração da silagem (Kung Jr. et al., 2018).

Nesse contexto, pesquisas são desenvolvidas a fim de melhorar a qualidade da silagem e aumentar a estabilidade aeróbia. Wilkinson & Muck (2019) afirmaram que um dos principais empecilhos no processo de ensilagem ocorre na colheita, quando a fermentação posterior pode ser influenciada pelo tamanho de partícula ou pelo uso de inoculantes. Assim, os inoculantes microbianos são os aditivos mais utilizados na atualidade, devido serem aditivos naturais e não apresentam riscos à saúde humana e animal, além de não provocar a corrosão de equipamentos ou contaminação do solo e da água, (Kung Jr. et al., 2003; Guo et al., 2022). Seu uso

poderá modular a fermentação durante o processo de ensilagem, gerando produtos metabólicos finais desejáveis (principalmente ácido láctico) na silagem, que contribuam para a preservação do material e inibição de microrganismos indesejáveis (Oliveira et al. 2017; Muck et al. 2018).

O uso de inoculantes microbianos na ensilagem tende a preservar o valor nutritivo, reduzir as perdas de MS, de proteólise e a deterioração aeróbia da silagem, com subsequente potencial de melhorar o desempenho animal (McDonald et al., 1991; Kung Jr. et al., 2003; Mceniry et al., 2007; Oliveira et al., 2017). Alguns inoculantes microbianos comerciais para silagem de milho são encontrados no mercado, sendo esses compostos por bactérias do ácido láctico (BAL) homo ou heterofermentativas (Tabacco et al., 2011). Muitas espécies de BAL têm sido avaliadas como inoculantes microbianos para silagem de milho. As espécies mais comuns são *Lactiplantibacillus plantarum* (heterofermentativo facultativo) e *Lentilactobacillus buchneri* (heterofermentativo obrigatório), sendo este último mais eficiente em aumentar a estabilidade aeróbia da silagem (Oude Elferink et al., 2001).

As BAL heterofermentativas obrigatórias possuem crescimento mais lento e são conhecidas pelo amplo desenvolvimento nas últimas fases de fermentação, produzindo maiores concentrações de ácido acético, o qual age na inibição do crescimento de fungos e leveduras (Hu et al., 2009; Santos et al., 2016), aumentando a estabilidade aeróbia das silagens (Kleinschmit & Kung Jr., 2006; Santos et al., 2016; Bernardi et al., 2019). O uso de BAL heterofermentativas obrigatórias podem elevar as perdas de MS devido a rota metabólica utilizada por elas. Entretanto, essas perdas durante a fermentação são mínimas ( $\leq 1\%$  MS) e compensadas pela maior estabilidade aeróbia ( $\geq 35$  h), em silagens de milho inoculadas (Kleismith & Kung Jr., 2006; Muck et al., 2018; Arriola et al., 2021).

O *L. buchneri* é uma BAL heterofermentativa obrigatória capaz de modular o perfil fermentativo das silagens (Kleinschmit & Kung Jr., 2006). Por não possuir a enzima acetaldeído desidrogenase, responsável pela redução de acetoaldeído a etanol, favorece o aumento na produção de ácido acético. O aumento das concentrações de ácido acético acontece também por intermédio da conversão anaeróbia do ácido láctico em ácido acético, produzindo também 1,2-propanodiol, etanol e CO<sub>2</sub>. O 1,2-propanodiol pode ainda ser convertido em propanol e ácido propiônico (Oude Elferink et al., 2001; Heini et al., 2012). Assim, o ácido acético possui

ação antifúngica maior que o ácido láctico, resultante da diferença de pKa entre eles, e irá inibir o desenvolvimento de mofo e leveduras presentes na silagem (Moon, 1983; Oude Elferink et al., 2001). Além de melhorar a estabilidade aeróbica, algumas cepas de *L. buchneri* são capazes de produzir esterase de ácido ferúlico, com capacidade de aumentar a digestibilidade da fibra da silagem (Jin et al., 2017).

Em estudo realizado por Tavares (2021), avaliou-se, em silagens de milho com ou sem inoculante bacteriano, avaliando a sua composição química e microbiológica, as perdas fermentativas e a estabilidade aeróbia, utilizando-se o inoculante Pioneer® 11C33, composto de cepas de *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus plantarum*. Verificou-se que o uso deste inoculante, foi eficiente em preservar nutrientes da silagem e promover aumento na estabilidade aeróbia, principalmente em silagens com ponto mais avançado de colheita.

Outro estudo com a mesma temática, realizado por Comino et al., (2014), observaram que a inoculação com *L. buchneri* quase dobrou a produção de ácido acético, em comparação com silagens não tratadas em diferentes estágios de maturidade (< 370g/kg de MS). Porém, independentemente do tratamento, a população de leveduras se reduziu abaixo do limite de detecção, quando o teor de ácido acético foi maior que 25g/kg de MS e, por conseguinte, a estabilidade aeróbia da silagem aumentou (> 200h) em relação ao tratamento controle.

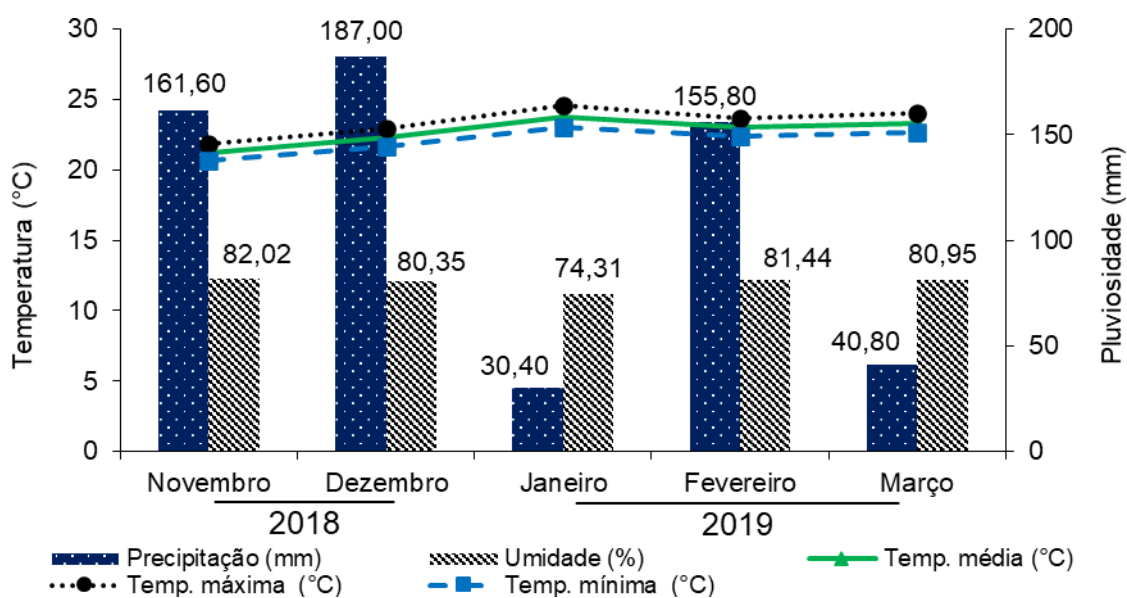
Nesse contexto, a compatibilidade entre a planta forrageira e o microrganismo inoculado favorece o uso bem-sucedido do inoculante microbiano em silagens (Muck, 2012). De acordo com Drouin et al. (2019) e Guo et al. (2022), apesar da eficácia dos inoculantes microbianos temos que ter em mente que essa ação pode ter interferência a depender do tipo de inoculante, da sua atividade biológica, taxa de aplicação, tipo de forragem, teor de MS, composição química, dentre outros fatores.

Com base em estudos realizados em condições tropicais em silagens de cana-de-açúcar, milho e leguminosas (Silva et al., 2018; Agarussi et al., 2019; Silva et al., 2020; Agarussi et al., 2022), a inoculação com cepas de BAL, obtidas em condições tropicais, promoveu melhorias significativas, comparada com os efeitos dos inoculantes comerciais que foram desenvolvidos em condições temperadas. Entretanto, esses estudos em silagem de milho são de grande importância.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Forragicultura e de Microbiologia de Silagem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, localizada na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil, na latitude Sul de 20°45' e longitude Oeste de 42° 52', com altitude média de 657 m. O clima é do tipo Cwb, segundo a classificação proposta por KÖPPEN, com precipitação média anual de 1341 mm. Os valores de precipitação pluviométrica diária, temperatura mínima, média e máxima mensal, durante o período de cultivo, estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Dados climáticos durante o cultivo de milho de novembro de 2018 a março de 2019. Fonte: Boletim Meteorológico da Universidade Federal de Viçosa (2021).

#### 3.2 Delineamento experimental

Foi utilizado o esquema fatorial 3 × 3 [três inoculantes (INOC) e três tempos de abertura do silo (TA)], no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os inoculantes foram: controle (CON, sem inoculante), inoculante comercial, Lalsil As, *L. buchneri* CNCM I-4323, Lallemand Animal Nutrition®, Brasil (LALSIL) e cepa de *L. buchneri*, isolado 90.14 (LB 90.14). Os tempos de abertura do silo foram: 20 (D20), 40 (D40) e 60 (D60) dias.

### **3.3 Preparo dos inoculantes microbianos**

#### **3.3.1 Cepa selvagem**

A cepa de *L. buchneri* 90.14, utilizada nesse estudo, pertence à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Silagem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. A cepa foi isolada previamente em estudos com silagens de sorgo forrageiro. As sequências da cepa selvagem foram depositadas no GenBank com o seguinte número de acesso: *L. buchneri* 90.14/MH936314.1.

A cepa, previamente estocada a -80 °C, foi cultivada em caldo MRS, durante 16 horas. Em seguida, foi realizado o plaqueamento em meio MRS ágar (Difco™ Lactobacilli MRS Agar, Detroit, MI, USA) e determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC). Com base na contagem, foi realizado os cálculos para determinar o volume de meio necessário para atingir a taxa de aplicação de  $1 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>. A cultura ativa foi submetida à centrifugação (1000 g × 10 minutos, 4 °C), e, imediatamente após, o sobrenadante foi eliminado e o sedimento de células obtido foi ressuscitado em 50 mL de água destilada, de acordo com Silva et al. (2020).

#### **3.3.2 Inoculante comercial**

O inoculante comercial usado foi o Lalsil As (*L. buchneri* CNCM I-4323; Lallemand, Brasil). A mesma quantidade de água utilizada no preparo das cepas selvagens (50 mL) foi usada para a reidratação do inoculante comercial.

O inoculante comercial também foi ajustado para aplicação na taxa de  $1 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> de forragem, com base na matéria natural. A taxa foi ajustada pela determinação prévia da população de bactérias lácticas presentes no inoculante, com o uso da contagem de bactérias lácticas em placas, utilizando-se o meio MRS ágar.

### **3.4 Cultivo, ensilagem do milho e abertura dos silos**

O milho Híbrido LG 6030 PRO2 foi cultivado em Viçosa (20°45'S e 42° 52'W), na UEPE-Forrageicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

O solo foi caracterizado como Latossolo vermelho-amarelo distrófico, textura média a argilosa (SBCS, 2018), preparado, corrigido e adubado conforme resultado

de análise química (Tabela 1) e exigência nutricional do milho. A adubação e os tratos culturais foram realizados conforme as recomendações do Manual de cultivo agrícola (5ª Aproximação) para o estado de Minas Gerais, Brasil (Ribeiro et al., 1999).

A semeadura do milho foi realizada em 14 de novembro de 2018, aplicando-se 27 kg da fórmula 08-28-16 de NPK.

**Tabela 1.** Resultados da análise química do solo

Local	pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	H + Al	SB	V
		----mg/dm <sup>3</sup> ----		-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----				
L1	5,4	2,2	123	1,94	0,79	4,29	3,04	41,5

pH em água, KCL e CaCl<sub>2</sub> relação: 1: 2,5. SB: soma de bases. V: saturação por bases

O milho foi colhido manualmente, para ensilagem, quando apresentava aproximadamente 30% de matéria seca, em 14/03/2019. Após a colheita, os materiais foram transportados ao Departamento de Zootecnia da UFV, onde foram triturados em máquina forrageira estacionária (modelo PN Plus 2000, Nogueira S.A., São João da Boa Vista, Brasil), em tamanho médio de partícula de 1,5 cm.

O material triturado foi dividido em pilhas de 10 kg cada (total de 36 pilhas), para a aplicação dos inoculantes, e, cada pilha foi ensilada em um balde. O inoculante foi diluído em 50 mL de água destilada e as pilhas foram tratadas individualmente, sendo o inoculante aplicado com auxílio de borrifadores manuais. O mesmo volume de água destilada foi aplicado no tratamento controle.

O material foi ensilado em baldes plásticos de 10 L de capacidade, previamente pesados (peso vazio), e compactado manualmente, adotando-se densidade média de 550 kg/m<sup>3</sup>. Os baldes foram vedados, pesados (peso cheio inicial) e armazenados à temperatura ambiente até o momento da abertura. Os silos foram abertos após 20, 40 e 60 dias de armazenamento.

No dia da abertura dos silos, os baldes foram novamente pesados (peso cheio final) e, em seguida, foram abertos. Após homogeneização, amostras foram coletadas para a avaliação de composição química, perfil fermentativo e populações microbianas. Para a avaliação da estabilidade aeróbia, 2 kg de silagem retornaram para seu respectivo balde. Uma segunda amostra foi usada para avaliação da composição química. Da mesma forma, outra amostra, de 25 g, foi usada para avaliação do perfil fermentativo e das populações microbianas das silagens após a exposição ao ar.

### 3.5 Perfil fermentativo e populações microbiana

As análises referentes ao perfil fermentativo e à contagem das populações microbianas foram realizadas na forragem *in natura* e nas respectivas silagens. Para isso, foi obtido um extrato aquoso, a partir de 25g de amostra homogeneizada em 225 mL de solução estéril (Ring Solution®, Oxoid), por 1 min., em liquidificador industrial. O extrato aquoso obtido foi filtrado em camada dupla de gaze estéril e, imediatamente após, foi mensurado o pH, com o auxílio de um potenciômetro digital (Tecnal, SP, Brazil).

Uma alíquota de 15 mL do extrato aquoso foi acondicionada em tubos contendo 1 mL de ácido sulfúrico 50%, e armazenada em freezer a -20°C, para posteriores análises de carboidratos solúveis (CHOs, Nelson, 1944), nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>, Okuda et al., 1965) e ácidos orgânicos. Para a quantificação de ácidos orgânicos, as amostras foram tratadas com hidróxido de cálcio e sulfato cúprico e analisadas de acordo com metodologia descrita por Siegfried et al. (1984). Utilizou-se o equipamento Waters alliance e2695 com Detector PAD 2998 (*photodiode array detector*), em sistema de separação, constituído de coluna de reversa C18 ODS 80A (150×4,6 mm×5 µm). As condições de análise foram: Fase móvel isocrática constituída de 100% de solução aquosa de fosfórico, pH 2,35-2,55, temperatura do forno de 50 +/- 2 °C, volume de injeção de amostra de 20 microlitros, tempo de corrida de 20 minutos e detector com comprimento de excitação de onda em 210 nm.

Uma segunda alíquota do extrato aquoso foi submetida a diluições seriadas, variando de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>, para contagem da população microbiana. O plaqueamento foi realizado pela técnica *pour plate* em placas de Petri estéreis. A população de BAL foi determinada em meio ágar MRS (Difco™ Lactobacilli MRS Agar, Detroit, MI, USA) e as placas foram incubadas a 37°C, por 48 h. O cultivo de enterobactérias foi realizado em meio VRB ágar (Violet Red Bile Agar, Detroit, MI, USA) e incubadas a 37°C, por 24 h. Mofos e leveduras foram cultivados em meio DRBC ágar (Dichloran Rose bengal Agar base, Oxoid™, Hampshire, Inglaterra) a 25°C, por 120 h e 72 h, respectivamente. Foram consideradas passíveis de contagem, as placas contendo entre 30 e 300 UFC. Para avaliação e interpretação dos dados referentes à contagem microbiana, os resultados obtidos foram convertidos para base logarítmica (Log<sub>10</sub> UFC).

### **3.6 Análises químicas**

Amostras da forragem antes da ensilagem e da silagem foram submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada de ar, a 55°C, por 72 horas, e moídas em moinho de facas (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com peneira de 1 mm. Posteriormente, as amostras foram analisadas quanto aos seus teores de matéria seca (MS, método 934.01), matéria mineral (MM, método 942.05), proteína bruta (PB, método 984.13) e fibra em detergente ácido (FDA, método 973.18), conforme AOAC (1990). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foram determinadas com a adição de  $\alpha$ -amilase termoestável, sem a utilização de sulfito de sódio, conforme Van Soest et al. (1991), modificado por Senger et al. (2008) para autoclave. O teor de amido foi obtido pelo método de Silva et al. (2019) e foram avaliados os teores de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) (Licitra et al., 1996).

### **3.7 Estabilidade aeróbia**

Os baldes com as amostras para avaliação da estabilidade aeróbia foram armazenados em sala com temperatura controlada ( $\pm 24^{\circ}\text{C}$ ). Um data logger foi inserido no centro da massa de silagem, em cada balde, para que a temperatura fosse registrada, a cada 10 min, por sete dias. Dois data loggers foram distribuídos na sala, para mensuração da temperatura ambiente. A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável, antes da temperatura subir 2°C acima da temperatura ambiente (Kung et al., 2021).

Ao final dos sete dias de exposição aeróbia, os baldes foram novamente pesados e a silagem foi homogeneizada e amostrada para mensuração do pH, estabilidade aeróbia, RMS (recuperação da matéria seca) e quantificação dos teores de CHOs e de ácidos orgânicos e das populações de leveduras e mofos, como previamente descritos.

### **3.8. Recuperação de matéria seca**

Para a estimativa da recuperação de MS da silagem, os baldes foram pesados à ensilagem (peso inicial), após os dias de armazenamento (peso final). A recuperação de MS foi calculada segundo Jobim et al. (2007), usando a equação:  $\text{RMS} = \text{MSab}/\text{MSfe} \times 100$ , onde: RMS = recuperação de matéria seca (%); MSab =

matéria seca da silagem na abertura (quantidade de silagem em kg × % MS); MSfe = matéria seca da forragem no fechamento (quantidade de forragem em kg × % MS).

### 3.9 Extração, purificação e sequenciamento de DNA

Uma terceira alíquota do extrato aquoso associado à planta (caracterização) e à silagem (20, 40 e 60 dias de armazenamento) foi utilizada para extração do DNA, visando reconhecer a diversidade microbiana fúngica desses materiais. A extração de DNA seguiu o método manual de extração, protocolo desenvolvido pela Neopropecta Microbiome Technologies® (Florianópolis, SC, Brasil), por meio do uso de soluções tampões e *beads* magnéticas.

O reconhecimento de fungos foi realizado utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho da região ITS1 dos DNAs extraídos. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para a região ITS1, primer ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA, doi: 10.1016/j.soilbio.2013.05.014), e, primer ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC, doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento single-end. As sequências foram analisadas por meio do pipeline Sentinel.

No pipeline Sentinel, os arquivos fastQ foram avaliados quanto à qualidade Phred (QP), usando-se o programa FastQC v.0.11.8 (Andrews, 2010). As *reads* foram submetidos ao Cutadapt (REF), para a remoção do primer F (GAACCGCGGARGGATCA) para empregado para a região ITS1. Apenas esse primer foi removido, por ser fonte de variação entre as sequências e apresentar melhor desempenho nos testes de remoção de primers (incluindo o primer R). As *reads* com primers removidos foram submetidas à *pipeline* USEARCH, com o algoritmo UNOISE ([https://www.drive5.com/usearch/manual/ex\\_miseq\\_its.bash](https://www.drive5.com/usearch/manual/ex_miseq_its.bash)), para a obtenção da tabela de *Operational Taxonomic Unit* (OTU). A classificação taxonômica foi realizada utilizando a USEARCH/UTAX reference datasets V 10.05.2021 (<https://unite.ut.ee/repository.php>).

### 3.10. Análise estatística

Os dados foram analisados por intermédio do procedimento GLM do SAS 9.4 (SAS System Inc., Cary, NC, USA). Os inoculantes, os tempos de abertura dos silos e a interação entre os fatores, foram consideradas efeitos fixos no modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T A_i + I_j + (T A \times I)_{ij} + e_{ijk}$$

Onde,  $Y_{ijk}$  = variável dependente;  $\mu$  = média geral;  $T A_i$  = efeito do tempo de abertura  $i$ ;  $I_j$  = efeito de inoculante  $j$ ;  $(T A \times I)_{ij}$  = interação entre os fatores  $i$  e  $j$ ;  $e_{ijk}$  = erro aleatório, assumindo uma distribuição normal independente (NID),  $(0; \sigma^2_{\epsilon})$ .

A homogeneidade das variâncias entre os tratamentos foi assumida e assim as variáveis referentes ao perfil fermentativo, população microbiana e composição química foram submetidas à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, considerando-se 0,05 como nível crítico para ocorrência do erro tipo I.

Para avaliação dos dados de diversidade microbiana, nas combinações que apresentaram significância estatística no teste ANOVA, foi empregado o teste Tukey, para realizar as comparações pareadas, usando-se a função `glht {multcomp (Bretz et al., 2011)}`, em ambiente R (R Core Team, 2018). Um estudo de abundância diferencial dos táxons foi realizado. Para isso, o Microbiome Analyst foi empregado no ambiente R, para a obtenção do objeto com formato adequado para o pacote `phyloseq`, seguido das análises de acordo com a pipeline (McMurdie e Holmes, 2013). Com isso, ASVs que tiveram  $\log_2(\text{fator de correção}) > 1,5$  ou  $\leq 1,5$  e P-valor  $< 0,05$ , foram consideradas com abundância diferencial entre as condições comparadas e destacadas no volcano plot. Nas comparações de estágios fenológicos, um P-valor mais restritivo foi empregado (0,001).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Forragem antes da ensilagem

A composição química e a população microbiana do milho planta-inteira, antes da ensilagem, estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição química (g kg<sup>-1</sup> MS), população microbiana (log UFC g<sup>-1</sup>) e pH da planta de milho antes in natura

Itens	INOCULANTES		
	CON	LALSIL	LB 90.14
MS (g kg <sup>-1</sup> MN)	302,0	305,7	301,3
PB	77,15	72,50	73,45
FDN	612,25	623,81	623,81
FDA	243,55	275,28	240,18
Amido	26,89	25,26	23,58
CHOs	16,34	15,56	15,50
pH	5,29	5,24	5,22
Populações microbianas (log UFC g <sup>-1</sup> )			
BAL	7,14	7,10	7,29
Enterobactérias	7,31	7,18	7,44
Leveduras	6,81	6,45	6,52
Mofos	6,09	6,43	6,45

<sup>a</sup> MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; Amido; CHOs: Carboidratos solúveis e BAL: Bactérias do ácido lático.

### 4.2. Composição química, perfil fermentativo e população microbiana das silagens

Houve efeito de interação TA×I (P≤0,05) sobre as variáveis FDA, NIDA, amido, pH, população de BAL, leveduras e ácido acético (Tabela 3). As variáveis MS e ácido propiônico foram afetadas pelos TA (P≤0,05) e INOC (P≤0,05), enquanto CHOS e ácido lático foram influenciadas apenas por INOC (P<0,05). A MM, PB, FDN e PMS não foram afetadas (P>0,05) por nenhum dos fatores estudadas.

**Tabela 3.** P-valor e coeficiente de variação (CV) de composição química, perfil fermentativo, populações microbianas e pH de silagens de milho com diferentes tempos de abertura do silo e inoculantes

Item <sup>a</sup>	P-valor <sup>b</sup>			CV
	TA	Inoculante	TA×Inoculante	
Composição química				
MS	0,0002	0,0006	0,3130	2,077
MM	0,6057	0,9713	0,6700	2,217
PB	0,7007	0,6946	0,5532	3,726
FDN	0,8073	0,2389	0,6647	4,576

FDA	<0,001	0,0006	<0,001	2,089
NIDA	0,0005	0,0810	0,0020	3,442
Amido	<0,001	0,1351	0,0421	10,581
CHOs	0,0539	<0,001	0,3286	5,011
<b>Perfil fermentativo</b>				
N-NH <sub>3</sub>	0,0045	0,7237	0,2005	18,590
Ácido lático	0,5384	<0,001	0,4291	13,194
Ácido Acético	0,0001	<0,001	0,0579	16,386
Ácido Propiônico	0,0215	0,2406	0,5937	5,175
pH	<0,001	<0,001	0,0376	1,030
PMS	0,0653	0,1757	0,2357	6,312
<b>Populações microbianas</b>				
BAL	0,0772	<0,001	0,0572	3,802
Leveduras	0,0133	<0,001	0,0480	12,07

<sup>a</sup> MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; CHOs: Carboidratos solúveis, N-NH<sub>3</sub>: Amônia expresso em N total; PMS: perdas de matéria seca e BAL: Bactérias do ácido lático.

<sup>b</sup> Probabilidade de efeito de tempos de abertura (TA), de inoculantes e de interação TA×I.

Os desdobramentos dos resultados das variáveis afetadas por TA x inoculante encontram-se na Tabela 4. Aos 20 dias, observou-se menor teor de FDA para a silagem LALSIL comparada com inoculada com LB 90.14. Já no D40 e D60 não houve diferença entre os tipos de inoculantes utilizados e no tratamento controle. Já quando comparamos os tempos de abertura os tratamentos controle e LB 90.14 não tiveram diferença independente do período de abertura, o tratamento LALSIL teve menor taxa de FDA no D20. (Tabela 4).

O teor de NIDA, no período de D40, as silagens não apresentaram diferença entre elas independente do inoculante utilizado, já no D20 os valores de NIDA foram maiores no tratamento controle e LB 90.14, e no D60 os valores de NIDA foi maior na silagem controle. A silagem LB 90,14 independe do período de abertura não apresentou diferença significativa, já a LALSIL proporcionou maiores valores no D40, não tendo diferença significativa com o D60, no entanto a silagem controle apresentou teor maior de NIDA no D20 (Tabela 4).

Foi observado que o teor de amido na silagem no D20 e D60 não houve diferenças entre as silagens inoculada ou não inoculadas, em contrapartida as silagens no D40 apresentaram maior teor de amido quando utilizado o inoculante isolado em nosso laboratório. Quando analisamos o tempo de abertura das silagens, os teores de amido foram maiores em todos os tratamentos no D60 (Tabela 4).

Observou-se os maiores pH na silagem inoculada com LB 90.14 em todos os períodos de abertura, exceto no D20 que o pH foi maior tanto na LB 90.14 e no CON. Quando analisado o tempo de abertura todos os tratamentos exibiram maiores valores no D40 e D60 (Tabela 4).

Foram registradas maiores populações de BAL para a silagem inoculadas com LB.90,14 em todas as aberturas, exceto em D60, onde a população desse grupo microbiano foi semelhante à da silagem inoculada com o inoculante comercial (Tabela 4). Observou-se redução das BAL com aumento dos tempos de abertura, quando utilizado a cepa selvagem, já nos demais tratamentos não observamos diferença quanto aos diferentes tempos de abertura.

A menor população de levedura foi na para a silagem LB 90.14, aos 60 dias de fermentação (Tabela 4). Independente do tempo de abertura, as silagens LB 90.14 apresentaram menor população de leveduras em relação ao controle.

Quando observamos os teores de ácido acético os maiores valores foram apresentados pelas silagens inoculadas com LB.90,14 em todos os períodos de aberturas, No tratamento CON e LALSIL independente do período de abertura não foi houve diferença estatística, já no LB 90.14 a taxa de ácido acético foi maior D60 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Composição química, perfil fermentativo e população microbiana de silagens de milho de diferentes tempos de abertura e inoculadas com diferentes cepas de *L. buchneri*

Inoculante <sup>a</sup>	TA <sup>b</sup>		
	D20	D40	D60
	FDA <sup>c</sup> (g kg <sup>-1</sup> MS)		
CON	228,50 Aa	234,00 Aa	232,40 Aa
LALSIL	117,21 Bb	224,32 Aa	232,40 Aa
LB 90.14	239,62 Aa	222,30 Aa	247,45 Aa
	NIDA <sup>c</sup> (g/kg MS)		
CON	0,6250 Aa	0,6075 Ab	0,6025 Ab
LALSIL	0,4250 Bb	0,5775 Aa	0,4375 Bab
LB 90.14	0,6150 Aa	0,5725 Aa	0,4650 Ba
	Amido		
CON	22,45 Ab	20,83 Bb	27,33 Aa
LALSIL	21,69 Ab	23,49 Bb	29,72 Aa
LB 90.14	22,48 Ab	26,98 Aab	27,72 Aa
	pH		
CON	3,52 ABb	3,68 Ba	3,62 Ba
LALSIL	3,49 Bb	3,70 Ba	3,65 Ba
LB 90.14	3,62 Ab	3,85 Aa	3,85 Aa
	BALc (log UFC g <sup>-1</sup> )		

CON	7,71 Ca	7,11 Ca	7,67 Ba
LALSIL	9,19 Ba	9,12 Ba	9,10 ABa
LB 90.14	9,77 Aa	9,55 Ab	9,13 Ac
LEVc (log UFC g <sup>-1</sup> )			
CON	6,09 Aa	5,82 Aa	5,77 Aa
LALSIL	5,06 Aa	4,32 Bab	3,55 Bb
LB 90.14	3,47 Ba	4,01 Ba	3,24 Bb
Ácido acético (%)			
CON	2,35 Ba	2,16 Ca	2,59 Ca
LALSIL	2,71 Ba	3,65 Ba	4,45 Ba
LB 90.14	4,47 Ab	5,82 Ab	6,45 Aa

<sup>a</sup> CON: silagem sem inoculante; LALSIL: Lalsil As.

<sup>b</sup> Período de abertura, 20 dias; 40 dias e 60 dias após a ensilagem.

<sup>c</sup> fibra em detergente ácido; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; BAL: bactérias do ácido láctico e LEV: leveduras.

Letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

Foi observado (Tabela 5) maior teor de MS para a silagem inoculada com LALSIL comparado com LB 90.14. Os maiores teores de MS também foram observados com D20 e D40. Em relação ao teor de N-NH<sub>3</sub>, verificou-se o maior valor na silagem no D60.

Observou-se os maiores valores de CHOs para silagem CON quando comparada com a silagem inoculada com lb90.14. Maiores concentrações de ácido láctico foram observadas para a silagem CON, as menores concentrações foram observadas nas silagens LB 90.14. Para os teores de ácido propiônico, nos diferentes tempos de abertura, o maior valor foi encontrado no D20 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Efeito de tempo de abertura e de Inoculante sobre a composição química, perfil fermentativo (g kg<sup>-1</sup>MS) e população microbiana (log UFC g<sup>-1</sup>) de silagens de milho com diferentes tempos de abertura e tratadas com diferentes cepas de *L. buchneri*

Itens <sup>a</sup>	Inoculante <sup>b</sup>			TA <sup>c</sup>		
	CON	LALSIL	LB 90.14	D20	D40	D60
MS	286,48 ab	289,58 a	279,08 b	289,41 a	287,51 a	278,23 b
MM	51,59	51,50	52,08	53,22	51,10	50,85
PB	70,47	70,85	71,39	70,79	71,41	70,52
FDN	540,00	527,82	556,81	547,56	536,77	540,30
N-NH <sub>3</sub>	4,53	4,76	4,80	4,23 b	4,43 b	5,44 a

CHOs	1,74 a	0,82 ab	0,40 b	1,29	0,86	0,82
PMS	5,95	5,09	8,17	4,35	6,45	8,41
AL	8,97 a	7,58 b	5,09 c	7,46	7,09	7,07
AP	2,79	2,09	1,88	3,19 a	1,89 b	1,68 b

<sup>a</sup> MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; PB: Proteína Bruta, FDN: Fibra em detergente neutro; CHOs: Carboidratos solúveis, PMS: perdas de matéria seca; AL: Ácido lático e AP: Ácido propiônico.

<sup>b</sup> CON: silagem sem inoculante; LALSIL: Lalsil As.

<sup>c</sup> Período de abertura, 20 dias; 40 dias e 60 dias após a ensilagem.

Letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade.

### 4.3. Estabilidade aeróbia

Foi observado efeito da interação TA×I para todas as variáveis avaliadas, exceto para RMS, que foi afetada por tempos de abertura e por inoculantes. O teor de matéria seca não foi afetado por nenhum dos fatores avaliados (Tabela 6).

**Tabela 6.** P-valor e coeficiente de variação (CV) das variáveis matéria seca, perfil fermentativo, pH, estabilidade aeróbia e populações microbianas de silagens de milho de diferentes tempos de abertura inoculadas com diferentes cepas de *L. buchneri*, após sete dias de exposição aeróbia

Itens <sup>a</sup>	P-valor <sup>b</sup>			CV
	TA	Inoculante	TA×Inoculante	
MS	0.3871	0.3491	0,4383	13,22
CHOs	0.4880	0,0115	0,0055	3,69
Ácido lático	0,033	0,0007	0,0090	5,99
Ácido acético	0,0013	<0,001	0,0002	4,98
Ácido Prop.	0,0005	0,0310	0,0073	9,98
pH	0.0084	<0,001	0.0002	11,56
RMS	0.0004	<0,001	0.1715	3,32
Mofos	<0,001	<0,001	<0,001	3,11
EA	0.0002	<0,001	<0,001	18,36
Leveduras	<0,001	<0,001	<0,001	7,90

<sup>a</sup> MS: Matéria Seca; CHOs: Carboidratos residuais; Ácido prop.: ácido propiônico; RMS: Recuperação de matéria seca; EA: Estabilidade aeróbia.

<sup>b</sup> Probabilidade de efeito de abertura, inoculante e de interação TA×I.

Comparando-se os inoculantes, observou-se que não houve quebra da estabilidade aeróbia das silagens que foram utilizadas a cepa LB 90.14, independente do tempo de abertura (Tabela 7). O tratamento controle teve menor estabilidade aeróbia em todos os tempos de abertura e o tratamento LALSIL não houve quebra da estabilidade aeróbia no D60.

Os valores de pH, após a exposição aeróbia, foram menores que 4 nas silagens que não tiveram a EA quebrada, ou seja, em todas os períodos de abertura do LB 90.14 e no D60 do LALSIL (Tabela 7).

Os teores de CHOs no D60 independente do inoculante utilizado não apresentou diferença significativa entre eles, no D20 os maiores teores foram apresentados quando utilizados o inoculante LB 90.14 e no D40 os maiores teores foram nas silagens inoculadas. O tratamento controle exibiu maior taxa de CHOs no D40, o LALSIL no D40 e D60, já o LB 90.14 apresentou maiores teores no D20 e D40 (Tabela 7).

Também foi observada (Tabela 7) que a maior população de leveduras nas silagens CON, em todos os tempos de abertura. As menores população de leveduras foram nas silagens que não tiveram a EA quebrada (todas os períodos de abertura do LB 90.14 e no D60 do LALSIL)

Após sete dias de exposição aeróbia, as concentrações de ácido láctico para a silagem LB 90.14 não diferiram independente do período de abertura, já a LALSIL teve maior concentração de ácido láctico no D40 e D60 e o tratamento CON no D60. No D20 a maior concentração desse ácido foi quando utilizado a cepa selvagem, no D40 e D60 nos tratamentos inoculados.

Quanto a concentração de ácido acético, para a silagem LB 90.14 não diferiram independente do período de abertura. Mas podemos notar que as maiores concentrações desse ácido foram nas silagens que não tiveram a EA quebrada (todas os períodos de abertura do LB 90.14 e no D60 do LALSIL). Já para a concentração de ácido propiônico, observou-se o menor valor na silagem inoculada com LB 90.14 e aberta após 40 dias.

Analisando a população de mofos na silagem LB 90.14 no D20 e D60, essas apresentaram as menores populações de mofos, comparadas as demais.

**Tabela 7.** Estabilidade aeróbia, perfil fermentativo, pH e população microbiana de silagens de milho de diferentes tempos de abertura inoculadas com diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri*, após sete dias de exposição aeróbia

Inoculante <sup>a</sup>	TA <sup>b</sup>		
	D20	D40	D60
	Estabilidade (h)		
CON	35,96 Bc	37,16 Bb	41,6 Ba
LALSIL	54,79 Bb	117,91 ABb	168 Aa
LB 90.14	168 Aa	168 Aa	168 Aa
	pH		
CON	5,89 Aa	7,21 Aa	6,41 Aa

LALSIL	6,07 Aa	4,82 ABb	3,73 Bb
LB 90.14	3,65 Ba	3,98 Ba	3,61 Ba
CHOs <sup>c</sup> (g kg <sup>-1</sup> MS)			
CON	0,4 Bb	0,54 Ba	0,53 Ab
LALSIL	0,43 Bb	0,79 ABa	1,08 Aa
LB 90.14	1,04 Aa	0,71 Aa	0,63 Ab
LEV <sup>c</sup> (log UFC g <sup>-1</sup> )			
CON	9,34 Aa	8,95 Aa	9,11 Aa
LALSIL	9,34 Aa	7,84 ABa	5,65 Bb
LB 90.14	4,62 Ba	5,35 Ba	3,93 Bc
Ácido láctico (g kg <sup>-1</sup> MS)			
CON	0,95 Bb	0,34 Bb	2,22 Ba
LALSIL	0,65 Bb	3,85 Aa	6,21 Aa
LB 90.14	5,29 Aa	3,25 Aa	3,99 ABa
Ácido acético (g kg <sup>-1</sup> MS)			
CON	0,60 Bb	0,29 Bc	1,17 Aa
LALSIL	0,33 Bc	2,04 ABb	4,46 Aa
LB 90.14	7,41 Aa	7,26 Aa	6,94 Aa
Ácido propiônico (g kg <sup>-1</sup> MS)			
CON	1,65 Aa	1,95 Ab	2,28 Ab
LALSIL	1,53 Ba	2,15 Aa	4,83 Aa
LB 90.14	2,19 Aa	0,78 Bb	2,22 Aa
Mofos (log UFC g <sup>-1</sup> )			
CON	5,08 Aa	6,35 Aa	6,03 Aa
LALSIL	4,19 Aa	4,01 Aa	2,03 Bb
LB 90.14	nd Bb	2,08 Aa	nd Cc

<sup>a</sup> CON: silagem sem inoculante; LALSIL: Lalsil As.

<sup>b</sup> Período de abertura, 20 dias; 40 dias e 60 dias após a ensilagem.

<sup>c</sup> CHOs: carboidratos residuais; LEV: Leveduras.

Letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

Houve efeito de inoculante ( $P < 0,001$ ) e de tempos de abertura ( $P = 0,0004$ ) sobre a RMS. As silagens inoculadas apresentaram maior recuperação de matéria seca (RMS) em relação a controle. Avaliando o efeito dos tempos de abertura, observou-se maior RMS para as silagens armazenadas por 60 dias, comparada com as demais (Tabela 8).

**Tabela 8.** Efeito do tempo de abertura e Inoculante sobre a Recuperação de matéria seca (g kg<sup>-1</sup>MS) de silagens de milho com diferentes períodos de aberturas tratadas com cepas de *Lactobacillus buchneri*

Itens <sup>a</sup>	Inoculante <sup>b</sup>			TA <sup>c</sup>		
	CON	LALSIL	LB 90.14	D20	D40	D60

RMS	89,32 b	93,70 a	96,18 a	91,85 b	90,98 b	96,36 a
-----	---------	---------	---------	---------	---------	---------

<sup>a</sup>RMS: Recuperação de matéria seca

<sup>b</sup>CON: silagem sem inoculante; LALSIL: Lalsil As.

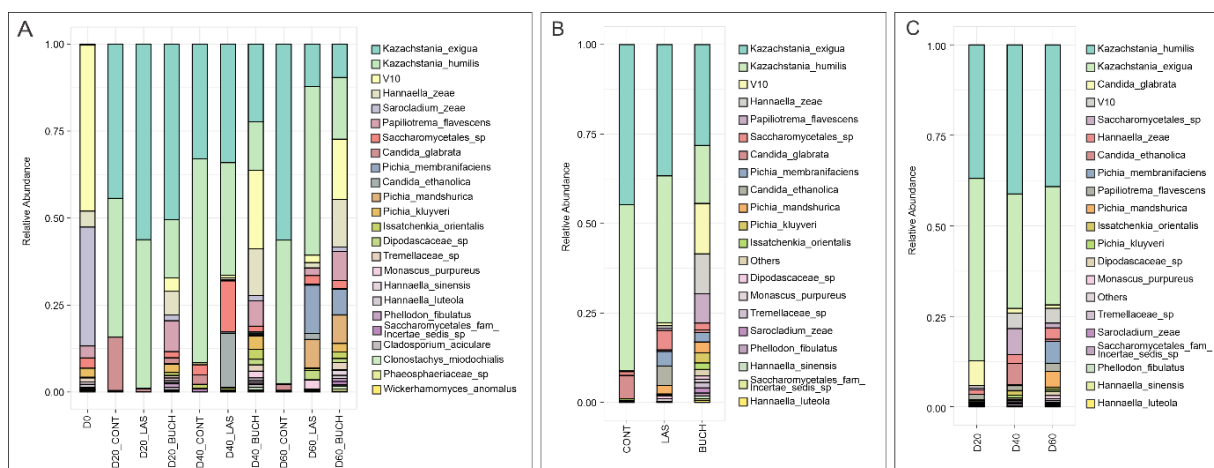
<sup>c</sup>Período de abertura, 20 dias; 40 dias e 60 dias após a ensilagem.

#### 4.4 Diversidade microbiana

Observou-se variação na abundância relativa da comunidade de microrganismos na forragem antes da ensilagem e nas silagens. Após a ensilagem, verificou-se a abundância relativa de alguns gêneros fúngicos, como *Kazachstania*, em todos TA (20, 40 d e 60 d). As silagens CON e inoculadas com LALSIL e LB 90.14 apresentaram ocorrência das espécies fúngicas *Kazachstania exigua* e *Kazachstania humilis* (Figura 2a).

As silagens de milho aos D40 e D60 e inoculadas com LB 90.14, apresentaram abundância relativa diversificada, enquanto as silagens de milho com D20 apresentaram a abundância relativa da espécie fúngica *Kazachstania exigua* seguida de *Kazachstania humilis* (Figura 2a).

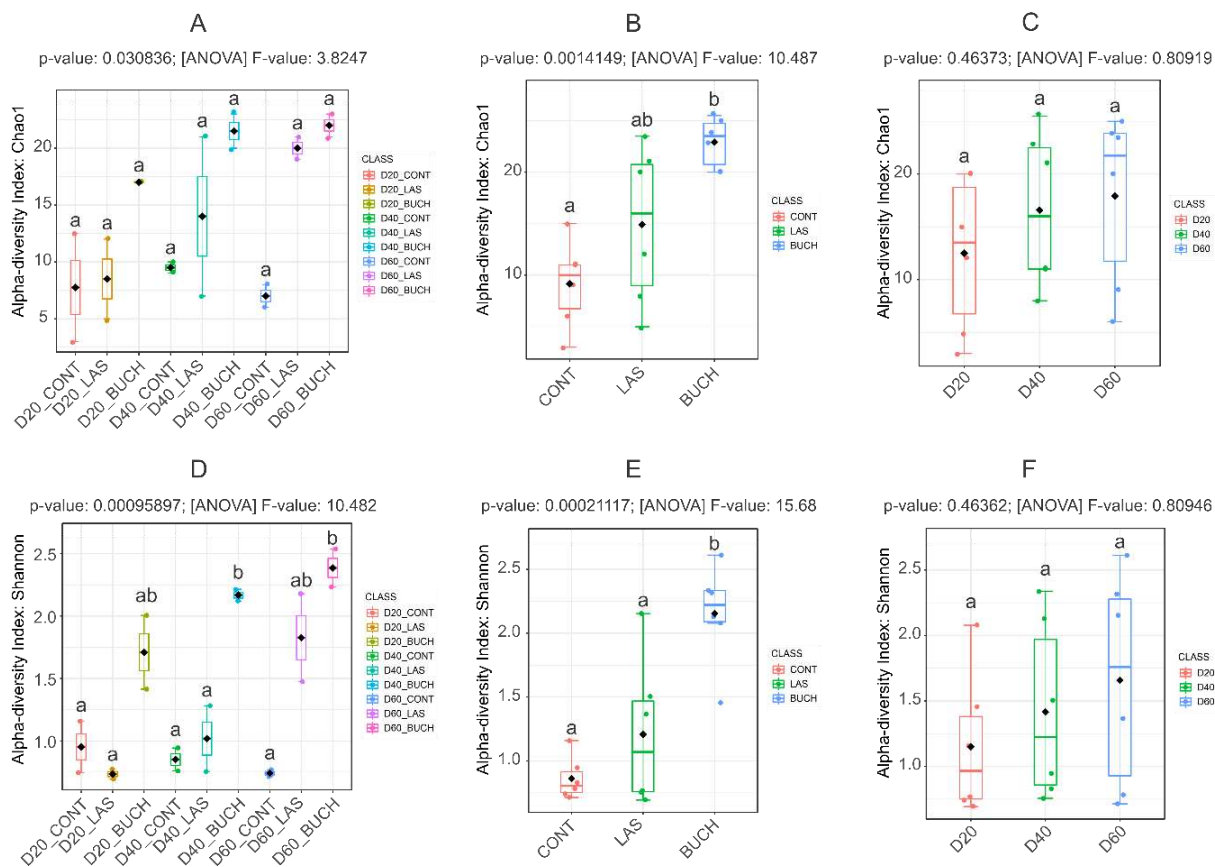
Em relação ao efeito de inoculante, independentemente do tempo de abertura, também se verificou a presença da espécie *Kazachstania exigua* (Figura 2b).



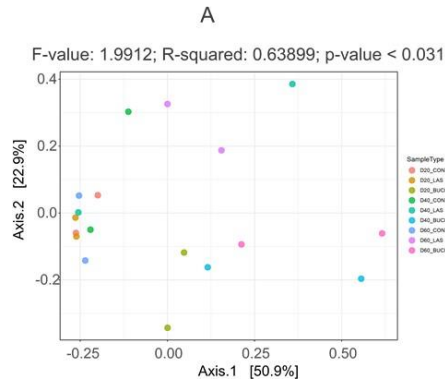
**Figura 2.** Abundância relativa da comunidade microbiana em nível de gênero revelada por amplificação do gene 16S rDNA de alto rendimento antes (D0, planta) e após ensilagem do milho, em função de inoculantes microbianos dentro dos períodos de abertura 20 d, 40 d e 60 d após ensilagem (a), em função do efeito de inoculante (b) e em função do período de abertura (c). CON, Controle (sem inoculante); LAS, Inoculante comercial (Lalsil As (*L. buchneri* CNCM I-4323; Lallemand, Brasil).); BUCH, Cepa *L. buchneri* 90.14.

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) para as análises de  $\alpha$ -diversidade, com base nos índices de Shannon e de Chao1, em função dos tempos de abertura (Figura 3C e 3F).

Por outro lado, quando analisamos as coordenadas principais (PCoA) da comunidade bacteriana da silagem de milho, a nível de gênero, notamos que houve efeito ( $P < 0,05$ ) para as análises de  $\beta$ -diversidade (Figura 4).



**Figura 3.** Alfa diversidade com base no índice Chao1 (A, B e C) e Shannon (D, E e F). A e D temos a alfa diversidade para a comunidade microbiana em silagem de milho, em função de inoculantes microbianos dentro do período de abertura 20 d, 40 d e 60 d após ensilagem (a, d), em função do efeito de inoculante (b, e) e em função do período de abertura (c, f). CONT, Controle (sem inoculante); LAS, Inoculante comercial (Lalsil As (*L. buchneri* CNCM I-4323; Lallemand, Brasil)).; BUCH, Cepa *L. buchneri* 90.14

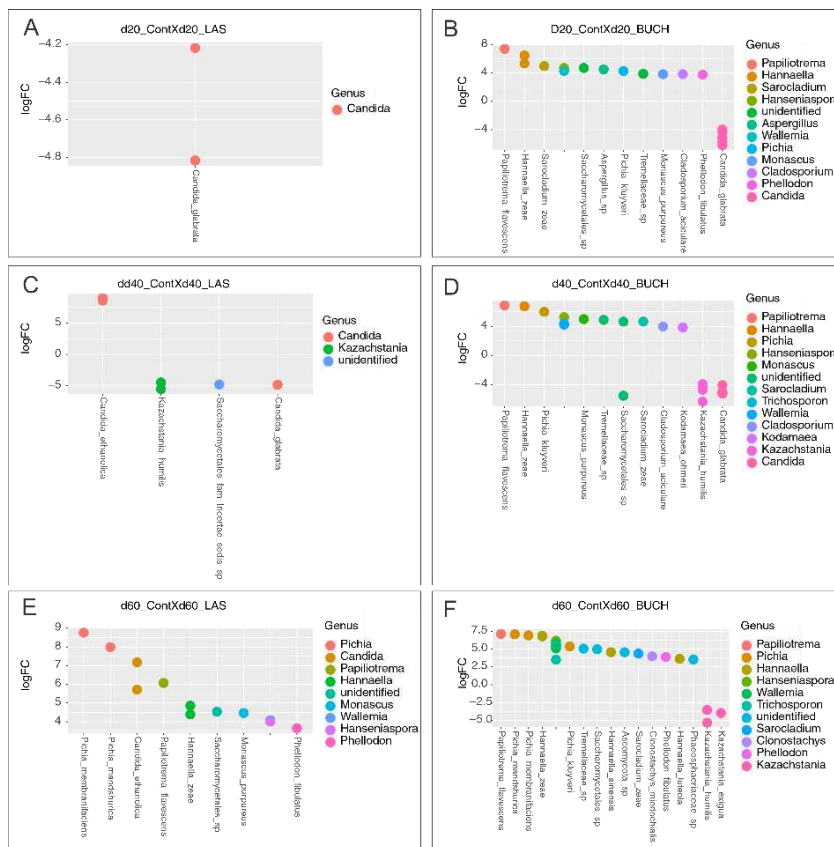


**Figura 4.** Análise de coordenadas principais (PCoA) da comunidade bacteriana a nível de gênero para silagem de milho. Cores distintas conforme a legenda da figura indica a dispersão dos tratamentos experimentais. 20d-CONT, silagem de milho controle 20 d para abertura; 20d-LAS, silagem de milho com inoculante comercial aos 20 d para abertura; 20d-BUCH, silagem de milho com isolado Cepa *L. buchneri* 90.14 aos 20 d para abertura.; 40d-CONT, silagem de milho controle 40 d para abertura; 40d-LAS, silagem de milho com inoculante comercial aos 40 d para abertura; 40d-BUCH, silagem de milho com isolado Cepa *L. buchneri* 90.14 aos 40 d para abertura.; 60d-CONT, silagem de milho controle 60 d para abertura; 60d-LAS, silagem de milho com inoculante comercial aos 60 d para abertura; 60d-BUCH, silagem de milho com isolado Cepa *L. buchneri* 90.14 aos 60 d para abertura.

A abundância diferencial de táxons foi afetada ( $P \leq 0,05$ ) pelos inoculantes avaliados, em ambos os tempos de abertura (Figura 5).

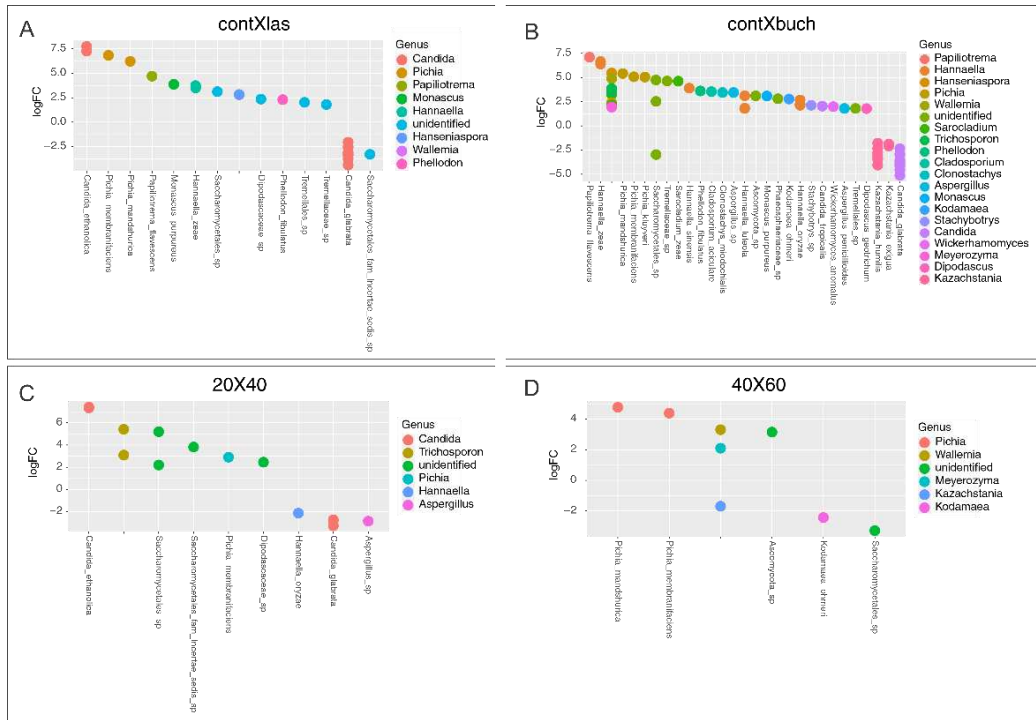
Na silagem após D20 de armazenamento, CON apresentou maior abundância diferencial de táxons para a gênero *Candida*, comparada com LALSIL, com predomínio da espécie *Gabrata*, em comparação a silagem controle (Figura 5A). Resultados semelhantes foram observados nas silagens aos D40, para os inoculantes CON comparadas com LALSIL, que apresentaram também maior abundância diferencial de táxons para a gênero *Candida*, contudo, com o predomínio da espécie *Ethanolica* (Figura 5C).

Já a silagem com D20, D40 e D60 CONT, quando comparadas com LB 90.14 apresentaram maior abundância para a gênero *Papilotrema*, com predomínio da espécie *Flavescens*, em comparação à silagem controle (Figura 5B, 5D e 5F). Quando observamos a silagem controle comparado com silagem com inoculante comercial, D60 (Figura 5E), notamos maior abundância para a gênero *Pichia*, com predomínio da espécie *Membranifaciens*.



**Figura 5.** Espécies que aumentam (eixo Y, logFC > 0) ou diminuem (eixo Y, logFC < 0) a abundância em silagem de milho em diferentes tempos de estabilidade aeróbica (d20, d40 e d60), tratadas com inóculos de LAS (A, C e E) e BUCH (B, D e F).

A predominância da abundância diferencial de táxons do gênero *Candida*, com maior ocorrência da espécie *Ethanolica*, também foi verificada ao se avaliar os efeitos de inoculantes, independentemente do período de abertura (Figura 6), seguido de menor predomínio também do gênero *Candida* da espécie *Gabrata*. Ao se comparar a abundância diferencial de táxons, entre as silagens D20 e D40, verificou-se que houve predomínio do gênero *Candida*, com maior ocorrência da espécie *Ethanolica* (Figura 6). Já quando comparamos a abundância diferencial de táxons, entre as silagens 40 d e 60 d, verificou-se que houve predomínio do gênero *Pichia*, com maior ocorrência da espécie *Mandshurica* (Figura 6).



**Figura 6.** Espécies que aumentam (eixo Y, logFC > 0) ou diminuem (eixo Y, logFC < 0) a abundância.

## 5. Discussão

### 5.1. Composição química, perfil fermentativo e população microbiana das silagens

Os teores de MS e de CHOs na silagem diminuíram após a fermentação, como resultado do consumo dos CHOs que são convertidos em ácido orgânicos, juntamente com formação de CO<sub>2</sub> e água, dependendo da rota metabólica utilizada pelos microrganismos envolvidos na fermentação (Dunière et al., 2013). Resultados semelhantes também foram verificados por Li et al. (2020), ao avaliarem a dinâmica das comunidades microbianas e o perfil fermentativo em silagem de alfafa aos 7, 14, 28 e 56 dias após ensilagem.

Os menores teores de FDN da silagem inoculada com LALSIL D40, comparada ao CON e a LB90.14, possivelmente decorra da hidrólise ácida da hemicelulose (Köhler et al., 2019; McDonald et al., 1991), uma vez que os inoculantes usados não apresentam enzimas fibrolíticas em sua composição.

O menor teor de PB na silagem de D60 comparada àquela de D20 e D40, possivelmente se deve a uma maior atividade proteolítica nessas silagens (Li et al., 2017; Kung Junior et al., 2018). A maioria das transformações das frações nitrogenadas advinda da proteína verdadeira ocorre devido à atividade enzimática da planta e às atividades microbianas. (Đorđević et al., 2019).

No presente estudo, silagens inoculadas com *L. buchneri*, tanto a cepa comercial (LALSIL) como a selvagem (90.14) apresentaram, em geral, valores de pH mais elevados, maiores concentrações de ácido acético, menores populações de mofos e leveduras. Altos valores de pH para silagens inoculadas com *L. buchneri* tem sido relacionado com a conversão do ácido lático em ácido acético e 1,2 propanodiol (Oude Elferink et al., 2001), o que não foi observado em nosso estudo.

O ácido acético é um ácido mais fraco que o lático e, portanto, menos eficiente em acidificar o meio (Kung et al., 2018). Contudo, independentemente do tempo de abertura e inoculante, todas as silagens apresentaram pH abaixo do limite superior de 4,2, referência para silagens de boa qualidade (Kung et al., 2018). No presente estudo a concentração de ácido lático foi maior na silagem controle comparadas com as silagens inoculadas, indicando a eficiência do uso do inoculante.

A maior população de BAL é nas silagens de D40 e D60 comparado ao de D20, embora possa-se inferir que ambas as forragens apresentaram populações de BAL da ordem de 5 log ufc/g, estabelecido por Muck (1996) como adequado para minimizar as perdas por fermentação no silo.

As maiores concentrações de ácido acético na silagem inculada com LB 45.22 e LB 90.14 inibiram a deterioração por mofos e leveduras (Driehuis et al., 1999; Nair et al., 2020; Arriola et al., 2021), uma vez que, as leveduras são assimiladoras de ácido láctico e são responsáveis por iniciar a deterioração aeróbia nas silagens (Pahlow et al., 2003). O ácido acético possui ação antifúngica maior que o ácido láctico, resultante da diferença de pKa entre eles. O ácido acético possui pKa de 4,76, permitido que ele fique na sua forma não dissociada na silagem, dessa forma ele se torna permeável na membrana das leveduras e ao entrar na célula, o ácido se dissocia liberando prótons, causando acidificação do meio intracelular, levando a morte da levedura por exaustão energética ou desnaturação de suas proteínas (Moon, 1983; Stratford et al., 2013).

Todas as silagens avaliadas apresentaram concentrações de N-NH<sub>3</sub> inferiores a 10% do NT, o que permite classificá-las como de boa qualidade, com base em critérios estabelecidos por McDonald et al. (1991) e Kung et al. (2018).

## 5.2. Estabilidade aeróbia

Segundo Muck et al. (2018) e Blajman et al. (2018), o *L. buchneri* é uma BAL heterofermentativa muito usada para melhorar a estabilidade aeróbia em silagens, a partir da produção de ácido acético, o qual possui atividade antifúngica. No nosso estudo, todas as silagens inoculadas apresentaram maior teor de ácido acético aos 40 e 60 dias de armazenamento, e assim maior estabilidade aeróbia.

Todas as silagens inoculadas com LB 90.14, apresentaram populações de levedura inferiores pressupostos por Kung et al. (1998) que estimaram que a estabilidade aeróbia pode atingir zero, quando a população de leveduras é  $\geq 6$  log UFC g<sup>-1</sup>. As leveduras geralmente são tolerantes ao meio ácido e utilizam além dos CHOs residuais, o ácido láctico como substrato para seu crescimento (Pahlow et al., 2003), o que explica os maiores valores de pH da silagem CON D40 e LALSIL D20, bem como, as menores concentrações de ácido láctico.

Além disso, as maiores concentrações de ácido acético na silagem inoculada com LB 90.14, após sete dias de exposição ao ar, foram suficientes para manter baixa a população de mofo e leveduras, refletindo em maior EA dessas silagens. Em revisão, Borreani et al. (2018) observaram alta correlação entre as perdas de MS e contagem de mofo. Entretanto, no experimento realizado por Borreani et al. (2018), não houve diferenças significativas para a RMS, diferente do nosso estudo que a recuperação da matéria seca foi maior nas silagens inoculadas com LB 90.14.

A população de fungos abaixo de 2 log ufc/g não compromete a qualidade da silagem, enquanto populações superiores a 5 log UFC g<sup>-1</sup> tornam as silagens propensas a maior deterioração aeróbia (Borreani et al., 2018; Woolford, 1990). No nosso estudo, a silagem COM em todos os períodos de abertura e a LALSIL D20 E D40 apresentaram valores superiores a este, refletindo em menor EA.

### 5.3 Diversidade microbiana

Houve variação da abundância relativa, ao se comparar amostras antes da ensilagem com aquelas de suas respectivas silagens. A microbiota epifítica da planta no campo varia em função das características ambientais, como por exemplo, clima, solo, temperatura, adubo e estágio de colheita, fatores esses que atuam em conjunto e influenciam diretamente a população bacteriana epifítica da planta (Leandro et al., 2019; Ren et al., 2020). Porém, após a ensilagem, é normal que ocorra variação da abundância relativa, devido às condições do meio mudarem drasticamente, com predominância de gêneros bacterianos mais adaptados às condições de anaerobiose e meio ácido que o processo fermentativo proporciona (Muck et al., 2018; Ali et al., 2020).

As espécies de leveduras mais abundantes em nosso estudo foram *Kazachstania humilis*, *Kazastania exigua* e *Hannaella zae*. As espécies de leveduras mais difundidas na massa fermentada foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania humilis* (anteriormente denominada *Candida humilis*), *Kazachstania exigua*, *Pichia kudriavzevii* e *Torulasporea delbrueckii*. Todas essas espécies de leveduras fermentam hexoses na ausência e na presença de oxigênio e, assim, convertem carboidratos em etanol, dióxido de carbono e ácido acético (De Vuyst et al., 2013; Lhomme et al., 2015; Miche et al., 2016; Lhomme et al., 2016; Van Kerrebroeck, et al., 2017). De acordo com Carbonetto et al. (2020), na presença de oxigênio, essas leveduras são

capazes de fermentar hexoses, se houver glicose suficiente, ou seja, são positivos para produção de álcool. Além de culturas de *K. humilis* associadas com *L. buchneri*, a quantidade de maltose que está esgotada é maior do que nas monoculturas de *L. buchneri*. Isto sugere que as culturas facilitam a absorção e/ou hidrólise da maltose, ou que as culturas diminuem a atividade da amilase e, portanto, a liberação da maltose do amido.

Outras espécies presentes na silagem controle foram *Candida glabrata* e *Candida ethanolica*, o que corrobora com estudo realizado por Moraes (2019), que identificou esses microrganismos em silagens de milho, após 29 dias de fermentação. A *Candida glabrata* é um patógeno oportunista de grande relevância, capaz de resistir às defesas do sistema imune de hospedeiros e causar severas infecções (Silva et al., 2012), sendo, portanto, um microrganismo indesejável na silagem.

O índice de Shannon mede a equabilidade de distribuição de abundâncias, ou seja, estima o grau de incerteza em prever que um determinado gênero ou uma determinada espécie pertencerá a um indivíduo (tratamento/inoculante) escolhido ao acaso, enquanto o índice de Chao1 estima o número de gêneros ou espécies raras dentro de uma amostra (Tian et al., 2021). Logo, se a maioria dos gêneros amostrados pelos índices de Chao1 e de Shannon forem similares entre as amostras estudadas, não serão identificadas diferenças entre os tratamentos avaliados (Li et al., 2018).

Com base na análise de abundância diferencial entre táxons, é evidente que o inoculante LB 90.14 contribuiu efetivamente para melhorias das características fermentativas das silagens de milho, devido a predominância da diversidade microbiana.

## 5. CONCLUSÕES

As cepas Lalsil e LB 90.14 foram eficientes em reduzir as populações de leveduras e mofos, e melhorar a estabilidade aeróbia de silagens de milho, indicando assim o grande potencial de uso da cepa selvagem LB 90.14 como inoculante na produção de silagem de milho, em condições tropicais. A utilização da cepa LB 90.14 também possibilita a abertura do silo após 20 dias de armazenamento. Quanto à diversidade microbiana, destaca-se a presença das espécies *Candida ethanolica* nas silagens avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- Agarussi, M.C.N., Pereira, O.G., da Silva, V.P. et al. (2019). Fermentative profile and lactic acid bacterial dynamics in non-wilted and wilted alfalfa silage in tropical conditions. *Mol Biol Rep* 46, 451–460. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4494-z>
- Agarussi, M.C.N., Pereira, O.G., Pimentel, F.E. et al. (2022). Microbiome of rehydrated corn and sorghum grain silages treated with microbial inoculants in different fermentation periods. *Sci Rep* 12, 16864. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21461-4>
- Ali, N., Wang, S., Zhao, J., Dong, Z., Li, J., Nazar, M., Shao, T. (2020). Microbial diversity and fermentation profile of red clover silage inoculated with reconstituted indigenous and exogenous epiphytic microbiota. *Bioresour. Technol.* 314, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123606>
- Arriola, K.G., Oliveira, A.S., Jiang, Y., Kim, D., Silva, H.M., Kim, S.C., Amaro, F.X., Ogunade, I.M., Sultana, H., Pech Cervantes, A.A., Ferraretto, L.F., Vyas, D., Adesogan, A.T. (2021). Meta-analysis of effects of inoculation with *Lactobacillus buchneri*, with or without other bacteria, on silage fermentation, aerobic stability, and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 104, 7653–7670. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19647>
- Arriola, K.G., Vyas, D., Kim, D., Agarussi, M.C.N., Silva, V.P., Flores, M., Jiang, Y., Yanlin, X., Pech-Cervantes, A.A., Ferraretto, L.F., Adesogan, A.T. (2021). Effect of *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri*, or their combination on the fermentation and nutritive value of sorghum silage and corn silage. *J. Dairy Sci.* 104, 9664–9675. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19512>
- Ashbell, G.; Weinberg, Z. G. (1992). Top silage losses in horizontal silos. *Can. Agric. Eng*, 34, 171-175.
- Ávila, C. L. S.; Carvalho, B. F. (2020). Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 128.4, 966-984.
- Auerbach, H., Nadeau, E. (2020). Effects of additive type on fermentation and aerobic stability and its interaction with air exposure on silage nutritive value. *Agronomy* 10, 1–16. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091229>
- Bernardi, A., Härter, C. J., Silva, A. W., Reis, R. A., Rabelo, C. H. (2019). A meta-analysis examining lactic acid bacteria inoculants for maize silage: Effects on fermentation, aerobic stability, nutritive value and livestock production. *Grass and Forage Science*, 74.4, 596-612.
- Blajman, J.E., Páez, R.B., Vinderola, C.G., Lingua, M.S., Signorini, M.L. (2018). A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 125, 1655–1669. <https://doi.org/10.1111/jam.14084>

- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R.J., Holmes, B.J., Muck, R.E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101, 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Cai, Y., Benno, Y., Ogawa, M., Kumai, S. (1999). Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *Journal of Dairy Science*, 82.3, 520-526.
- Carbonetto B, Nidelet T, Guezenec S, Perez M, Segond D, Sicard D. (2020). Interactions between *Kazachstania humilis* Yeast Species and Lactic Acid Bacteria in Sourdough. *Microorganisms*. 8 (2), 240. doi: 10.3390/microorganisms8020240
- COMINO, L., TABACCO, E., RIGHI, F., REVELLO-CHION, A., QUARANTELLI, A., BORREANI, G. Effects of an inoculant containing a *Lactobacillus buchneri* that produces ferulate-esterase on fermentation products, aerobic stability, and fibre digestibility of maize silage harvested at different stages of maturity. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 198: 94-106
- Costa, D.M., Carvalho, B.F., Bernardes, T.F., Schwan, R.F., Ávila, C.L. da S. (2021). New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage harvested at late maturity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 274. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114852>
- Daniel, J. L. P., Bernardes, T. F., Jobim, C. C., Schmidt, P., Nussio, L. G. (2019). Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. *Grass and Forage Science*, 74.2, 188-200.
- Da Silva, N.C., Nascimento, C.F., Nascimento, F.A., de Resende, F.D., Daniel, J.L.P., Siqueira, G.R. (2018). Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *J. Dairy Sci.* 101, 4158–4167. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13797>
- De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Harth H., Huys G., Daniel H.M., Weckx S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiol.* 37, 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>
- Dorđević, S., Mandić, V., Djordjević, N., & Pavlović, B. (2019). Bacterial inoculant effect on quality of alfalfa silage and haylage. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 35(1), 85–96. <https://doi.org/10.2298/BAH1901085D>
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I., Thévenot-Sergentet, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 182, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006>
- Ferraretto, L. F.; Shaver, R. D. (2015). Effects of whole-plant corn silage hybrid type on intake, digestion, ruminal fermentation, and lactation performance by dairy cows through a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 98.4, 2662-2675

- Ferraretto, L. F.; Shaver, R. D.; Luck, B. D. (2018). Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. *Journal of dairy science*, 101.5, 3937-3951
- Filya, I. Sucu, E. (2010). The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass Forage Sci*, 65, 446–455.
- Gallagher, D., Parker, D., Allen, D.J., Tsesmetzis, N. (2018). Dynamic bacterial and fungal microbiomes during sweet sorghum ensiling impact bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 264, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.053>
- Guan, H., Shuai, Y., Yan, Y., Ran, Q., Wang, X., Li, D., Cai, Y., Zhang, X. (2020). Microbial community and fermentation dynamics of corn silage prepared with heat-resistant lactic acid bacteria in a hot environment. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050719>
- Heinl, S., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Blom, J., Linke, B., Goesmann, A., Grabherr, R., Schwab, H., Pühler, A., Schlüter, A. (2012). Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *J. Biotechnol.* 161, 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.007>
- Hu, W., Schmidt, R. J., Mcdonell, E. E., Klingerman, C. M., Kung Jr, L. (2009). The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *Journal of dairy science*, 92.8, 3907-3914.
- Jin, L., Dunière, L., Lynch, J.P., Zaheer, R., Turkington, K., Blackshaw, R.E., Lupwayi, N.Z., O'Donovan, J.T., Harker, K.N., McAllister, T., Baah, J. and Wang, Y. (2017). Impact of ferulic acid esterase-producing lactobacilli and fibrolytic enzymes on ensiling and digestion kinetics of mixed small-grain silage. *Grass Forage Sci.* 72, 80-92. <https://doi.org/10.1111/gfs.12217>
- Kleinschmit, D.H., Kung, L. (2006). A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *J. Dairy Sci.* 89, 4005–4013. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72444-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72444-4)
- Köhler, B., Taube, F., Ostertag, J., Thurner, S., Kluß, C., Spiekens, H. (2019). Dry-matter losses and changes in nutrient concentrations in grass and maize silages stored in bunker silos. *Grass Forage Sci.* 74, 274–283. <https://doi.org/10.1111/gfs.12430>
- Kung, L., Savage, R.M., da Silva, E.B., Polukis, S.A., Smith, M.L., Johnson, A.C.B., Miller, M.A. (2021). The effects of air stress during storage and low packing density on the fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* 40788. *J. Dairy Sci.* 104, 4206–4222. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19746>
- Kung, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>

- Kung, L., Sheperd, A.C., Smagala, A.M., Endres, K.M., Bessett, C.A., Ranjit, N.K., Glancey, J.L. (1998). The Effect of Preservatives Based on Propionic Acid on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage and a Total Mixed Ration. *J. Dairy Sci.* 81, 1322–1330. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75695-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75695-4)
- Kung Jr, L., Stokes, M. R., Lin, C. J.(2003). Silage additives. *Silage science and technology*, 42, 305-360.
- Leandro, E. dos S., de Oliveira, M. N. V., Rufino, L. D., Ribeiro, K. G., & Pereira, O. G. (2019). Microbial characterization of *Arachis pintoi* and its silages at different fermentation periods. *Molecular Biology Reports*, 46(5), 5019–5024. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04952-y>
- Lhomme E., Lattanzi A., Dousset X., Minervini F., de Angelis M., Lacaze G., Onno B., Gobbetti M. (2015). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* 215, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.015>
- Lhomme E., Urien C., Legrand J., Dousset X., Onno B., Sicard D. (2016). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiol.* 53, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.014>
- Li, D. X., Ni, K., Zhang, Y., Lin, Y., & Yang, F. (2018). Influence of lactic acid bacteria, cellulase, cellulase-producing *Bacillus pumilus* and their combinations on alfalfa silage quality. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(12), 2768–2782. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62060-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62060-X)
- Li, M., Zhou, H., Zi, X., & Cai, Y. (2017). Silage fermentation and ruminal degradation of stylo prepared with lactic acid bacteria and cellulase. *Animal Science Journal*, 88(10), 1531–1537. <https://doi.org/10.1111/asj.12795>
- Li, R., Jiang, D., Zheng, M., Tian, P., Zheng, M., & Xu, C. (2020). Microbial community dynamics during alfalfa silage with or without clostridial fermentation. *Scientific Reports*, 10(1), 17782–17799. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74958-1>
- McAllister, T.A., Dunière, L., Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K., Zaheer, R. (2018). Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *J. Dairy Sci.* 101, 4060–4074. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>
- McDonald P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. (1991) *Biochemistry of Silage* 340 Marlow Chalcombe Publications.
- McEniry, J., P. O’Kiely, N. J. W. Clipson, P. D. Forristal, and E. M. Doyle. (2007). Manipulating the ensilage of wilted, unchopped grass through the use of additive treatments. *Ir. J. Agric. Food Res.* 16, 77–91
- Michel E., Monfort C., Deffrasnes M., Guezenc S., Lhomme E., Barret M., Sicard D., Dousset X., Onno B. (2019). Characterization of relative abundance of lactic acid bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods. *Int. J. Food Microbiol.* 239, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.034>

- Morais, L. B. (2019). Diversidade de fungos em silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri* (CCMA 1366) ou *Lactobacillus farraginis* (CCMA 1362). Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras.
- Moon, N. J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures, 453–460
- Muck, R.E. (1990). Prediction of lactic acid bacterial numbers on lucerne. *Grass Forage Sci.* 45, 273–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1990.tb01950.x>
- Muck, R.E., Nadeau, E.M.G., McAllister, T.A., Contreras-Govea, F.E., Santos, M.C., Kung, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* 101, 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- Muck, R. E., Kung Jr, L., Collins, M. (2020). Silage production. *Forages: The Science of Grassland Agriculture.* 2, 767-787
- Nair, J., Huaxin, N., Andrada, E., Yang, H.E., Chevaux, E., Drouin, P., McAllister, T.A., Wang, Y. (2020). Effects of inoculation of corn silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on silage quality, aerobic stability, nutrient digestibility, and growth performance of growing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 98, 1–11. <https://doi.org/10.1093/JAS/SKAA267>
- Ni, K., Zhao, J., Zhu, B., Su, R., Pan, Y., Ma, J., Zhou, G., Tao, Y., Liu, X., & Zhong, J. (2018). Assessing the fermentation quality and microbial community of the mixed silage of forage soybean with crop corn or sorghum. *Bioresource Technology*, 265, 563–567. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.097>
- OECD/FAO. (2021). OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. doi:10.1787/19428846-en.
- O’Kiely, P., Muck, R.E. (1992). Aerobic deterioration of lucerne and maize silages-effects of yeasts. *J. Sci. Food Agric.* 59, 139–144.
- Oliveira, A. S., Weinberg, Z. G., Ogunade, I. M., Cervantes, A. A., Arriola, K. G., Jiang, Y., Kim, D., Li, X., Gonçalves, M. C. M., Vyas, D., Adesogan, A. T. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 100.6. 4587-4603.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, E.J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 125–132. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elfrink, S.J., Oude Elferink, S.J.W., Spoelstra, S.F. (2003). Microbiology of Ensiling. *Silage Sci. Technol.* 31–93.
- Pinto, A.P.; Mizubuti, I.Y.; Ribeiro, E.L.A.; Fey, R.; Palumbo, G.R.; Alves, T.C. (2007). Avaliação da silagem de bagaço de laranja e silagem de milho em diferentes períodos de armazenamento. *Acta Scientiarum. Animal Science*, 29, 4, 371 377.

- Rabelo, C. H. S., Rezende, A. V. de ., Rabelo, F. H. S., Nogueira, D. A., Senedese, S. S., Vieira, P. de F., Bernardes, C. L., & Carvalho, A.. (2014). Silagens de milho inoculadas microbiologicamente em diferentes estádios de maturidade: perdas fermentativas, composição bromatológica e digestibilidade in vitro. *Ciência Rural*, 44(2), 368–373. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000200028>
- Ren, H., Feng, Y., Pei, J., Li, J., Wang, Z., Fu, S., Zheng, Y., Li, Z., & Peng, Z. (2020). Effects of *Lactobacillus plantarum* additive and temperature on the ensiling quality and microbial community dynamics of cauliflower leaf silages. *Bioresource Technology*, 307(20), 1232–1245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123238>
- Santos, A. O., Ávila, C. L. S., Pinto, J. C., Carvalho, B. F., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2016). Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 120. 2. 266-279.
- Schmidt, R.J., Kung, L. (2010). The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *J. Dairy Sci.* 93, 1616–1624. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2555>
- Silva, S. Et Al. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol.*, v. 36, p. 288-305.
- Silva, B. De C., L. A. Godoi, S. De C. Valadares Filho, D. Zanetti, P. D. B. Benedeti, E. Detmann. (2019). A suitable enzymatic method for starch quantification in different organic matrices. *MethodsX*. 6:2322–2328. doi:10.1016/j.mex.2019.09.040.
- Stratford, M., Nebe-von-Caron, G., Steels, H., Novodvorska, M., Ueckert, J., & Archer, D. B. (2013). Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.013>
- Tabacco, E., Piano, S., Revello-Chion, A., Borreani, G. (2011). Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *Journal of dairy science*. 94.11. 5589-5598.
- Tennant, R.K., Sambles, C.M., Diffey, G.E., Moore, K.A., Love, J. (2017). Metagenomic analysis of silage. *J. Vis. Exp.* 119, 1–11. <https://doi.org/10.3791/54936>
- Tian, H., Wang, Y., Liu, Z., Hu, Z., Guo, Y., Deng, M., Liu, G., & Sun, B. (2021). Effects of Malic Acid and Sucrose on the Fermentation Parameters, CNCPS Nitrogen Fractions, and Bacterial Community of *Moringa oleifera* Leaves Silage. *Microorganisms*, 9(10), 2102–2115. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102102>

- Van Kerrebroeck S., Maes D., De Vuyst L. (2017). Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 68, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.016>
- Wang, C., Han, H., Sun, L., Na, N., Xu, H., Chang, S., Jiang, Y., Xue, Y. (2021). Bacterial succession pattern during the fermentation process in whole-plant corn silage processed in different geographical areas of northern China. *Processes* 9. <https://doi.org/10.3390/pr9050900>
- Wang, S., Li, J., Dong, Z., Chen, L., Yuan, X., Shao, T. (2018). The effects of lactic acid bacteria strains isolated from various substrates on the fermentation quality of common vetch (*Vicia sativa* L.) in Tibet. *Grass Forage Sci.* 73, 639–647. <https://doi.org/10.1111/gfs.12363>
- Wilkinson, J.M., Muck, R.E. (2019). Ensiling in 2050: Some challenges and opportunities. *Grass Forage Sci.* 74, 178–187. <https://doi.org/10.1111/gfs.12418>
- Weinberg, Z. G., Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews.* 19.1, 53-68.
- Woolford, M.K. (1990). The detrimental effects of air on silage. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 101–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02554.x>